

11204 10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

ABORDAJE CLINICO-GENETICO DEL  
FACTOR MASCULINO EN ESTERILIDAD

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO EN LA  
ESPECIALIDAD DE:  
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION  
HUMANA



PRESENTA:  
DR. MAURICIO OSORIO CABALLERO

*Handwritten signature*

ASESORES DE TESIS:  
DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS  
DRA. MIRNA GPE. ECHEVERRIA SANCHEZ

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



MÉXICO, D.F.



285812

FEBRERO 2000

DIRECCION DE ENSEÑANZA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL  
DE PERINATOLOGIA**

**ABORDAJE CLINICO-GENETICO  
DEL FACTOR MASCULINO  
EN ESTERILIDAD**

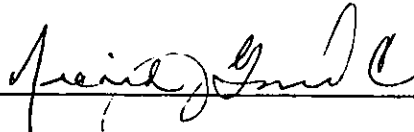
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO  
DE ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA  
DE LA REPRODUCCION HUMANA**

**P R E S E N T A :**

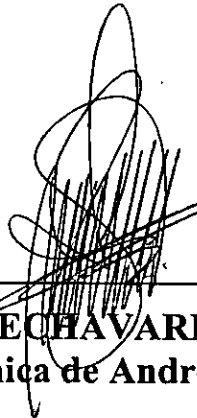
**DR.MAURICIO OSORIO CABALLERO**

**ASESORES:**



---

**DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS**  
**Subdirector de Investigación Biomédica**



---

**DRA. MIRNA ECHAVARRIA SÁNCHEZ**  
**Jefa de la clínica de Andrología**

## DEDICATORIA

### A DIOS:

Por darme la oportunidad de vivir éste momento, y llegar hasta donde en algún momento parecía muy distante.

### A MIS PADRES:

Por el amor, apoyo y esfuerzo que siempre me han brindado.

### AL DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS Y A LA DRA MIRNA ECHAVARRIA SANCHEZ:

Por ser personas con inmesurable calidad humana y siempre compartir esa gran sapiencia con la humildad que caracteriza a los grandes.

### A TODOS LOS PROFESORES QUE PARTICIPARON EN MI FORMACION PARA LOGRAR ESTE NUEVO PELDAÑO PROFESIONAL

### AL INPer Y A TODOS NUESTROS PACIENTES:

Por darnos la posibilidad de aprender y motivarnos a ser cada vez mejores.

## INDICE

INTRODUCCION	1
MARCO TEORICO	12
OBJETIVO PRINCIPAL	23
MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS	24
ANALISIS DE	26
RESULTADOS	
CUADROS Y GRAFICAS	27
FLUJOGRAMA DE	31
MANEJO	
CONCLUSION	32
BIBLIOGRAFIA	33

## INTRODUCCION

En la última década, se ha podido observar una gran explosión de la información en genética y su aplicación en la medicina, todo ello abre un campo interesante y fundamental en el análisis de enfermedades que en ocasiones no se pensara fueran genéticas, determinaciones diagnósticas, cálculo de riesgo para las enfermedades de origen genético, y la potencialidad de prevenir y corregir alteraciones de la reproducción en la Gineco-Obstetricia moderna. El crecimiento exponencial de la genética se ha dado al conocer las bases moleculares de las enfermedades o principios de las alteraciones, así como la posibilidad de detectar los portadores o bien los afectados con expresiones mínimas del padecimiento con evidencias que permiten manejar la medicina genómica actualmente .

Uno de los grandes proyectos de vida del ser humano, es la procreación, la cual genera e incluye aspectos biológicos, como la interacción genoma-ambiente, psicológicos, personales y sociales que son la base de la permanencia de la especie humana y de sus variantes normales. Sin embargo, en la compleja vía biológica puede condicionarse la posibilidad de error, y la consecuente alteración en la reproducción. En el humano, estos procesos son mucho más complejos que cualquier otro sistema o modelo animal. (1)

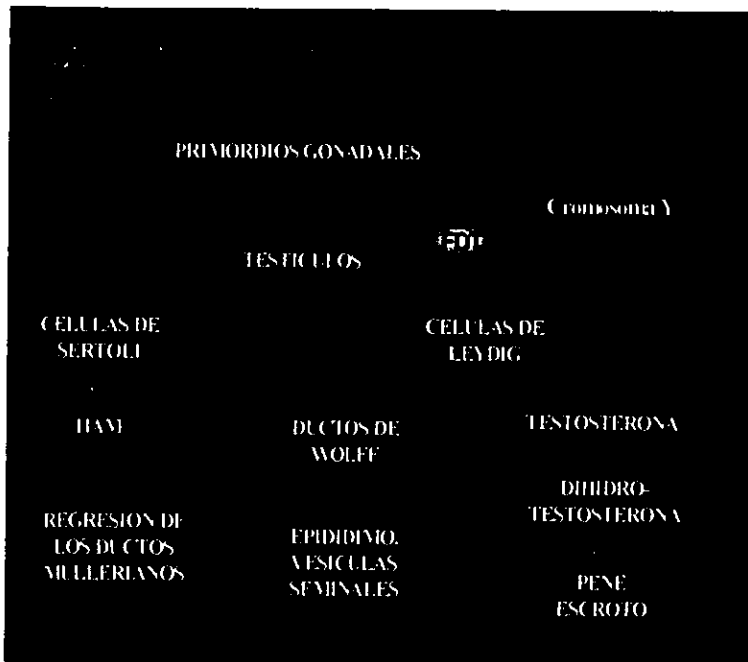
Durante la gametogénesis, la meiosis es el proceso más importante y fundamental de la genética ya que permite la reprogramación del material genético de ambos padres, el cual sigue patrones especiales que determinan su expresión diferencial reconocido actualmente como "IMPRONTA GENOMICA", la cual explica su juego en la formación del nuevo ser tanto a nivel del embrión como de la placenta

La infertilidad afecta aproximadamente 10% de las parejas en etapa reproductiva y aproximadamente 50% de estos casos pueden ser atribuidos al factor masculino. Algunos grupos han expresado que los índices de infertilidad masculina van en aumento (2). La infertilidad masculina se ha convertido en un paradigma y fuente de estudio de gran interés para los profesionales que trabajan en reproducción, la Genética y la Biología Celular y Molecular son hoy por hoy una

herramienta diagnóstica y probablemente terapéutica a fines de siglo. Esta tecnología ha permitido abordar al humano como un modelo de estudio desde la gametogénesis (3).

Actualmente el ratón es el modelo animal idóneo para investigar alteraciones en la gametogénesis. Estudios fisiológicos en el ratón indican que la espermatogénesis, y los pasos posteriores como son la maduración espermática, y su activación están sujetos a regulaciones muy complejas pero que podrían traspolarse al hombre lo que implicaría que estos eventos regulatorios puedan ser la explicación de no pocos casos de infertilidad en el hombre.

La estructura del cromosoma "Y" y su papel en el desarrollo sexual se ha analizado a nivel molecular. En la meiosis del varon, los cromosomas "X" e "Y" normalmente se aparean por segmentos en los extremos de sus brazos cortos y ocurre recombinación en esta región. El segmento apareado incluye la región pseudoautosómica en los cromosomas "X" e "Y" llamadas así por que las copias ligadas a esta zona que son homologas entre sí, igual que en los pares de autosomas.





El cromosoma "Y" ha sido la atención de múltiples estudios, muchos de los cuales implican el análisis genético y su relación con la infertilidad masculina. Actualmente tanto la estructura en imagen citogenética como los estudios moleculares son fundamentales en el estudio de la infertilidad masculina. El cromosoma "Y" es el más pequeño de los cromosomas humanos, contiene < 2% del genoma haploide lo que correspondería aproximadamente a 60,00,000 de pares de bases. Llama la atención el gene SRY en el brazo corto para la diferenciación testicular y el gene de la antiazospermia o de la espermatogénesis en el brazo largo. Se han secuenciado hasta la fecha 196 fragmentos de este cromosoma.

La clonación de genes ha permitido llevar a cabo estudios sobre el cromosoma "Y" en el desarrollo normal y anormal del varón. Recientemente en 1998, doce nuevos genes o familias de genes, con diez secuencias largas de DNA fueron identificados mediante una búsqueda sistemática de la región no-recombinante del "Y" (NRY) brazo corto (4). Entre los genes localizados en NRY, el gen determinante del sexo (SRY), se conoce como crucial para la formación testicular. Sin embargo, microdeleciones en el cromosoma Yq11 (brazo largo del "Y") se han observado en 10-15% de los pacientes Azoospermicos u Oligozoospermicos severos (5). El análisis de estas deleciones demostraron que al menos 3 loci (el loci del azoospermic-factor(AZFa-c) AZFa, AZFb y AZFc, además del SRY, representan el factor etiológico, con muy alta prevalencia en las testiculopatías como el Síndrome de Células de Sertoli.

Existen genes candidatos a intervenir en la fertilidad masculina pero no se han podido identificar completamente como son: RBM, para AZFb, DAZ (deleted in azoospermia) y SPGY para AZFc. Todos estos genes candidatos como los homólogos en autosomas DAZLA y SPGYLA que codifican en forma putativa para RNA-ligando a proteínas que se expresan solamente en gónada masculina

Un patrón que se conserva para el DAZ y el DAZLA en la espermatogénesis es sugerido por su semejanza con el gen de la

Drosophila, el cual se requiere para la fertilidad en la mosca macho (6). Por otra parte, los ratones que presentan una deleción de DAZLA son incapaces de producir gametos, demostrando que el DAZLA es esencial para la diferenciación de células germinales (7).

**Secuencia de activación genética que dispara la organogénesis testicular y el dimorfismo sexual.**

## **DIFERENCIACIÓN SEXUAL**

Para poder introducirnos al intrincado proceso de la diferenciación sexual es necesario el abordaje multidisciplinario apoyándose en la embriología moderna, la Genética clínica y molecular y la Endocrinología entre otras.

El análisis del dimorfismo sexual incluyen los siguientes pasos:

---

Diferenciación primaria	1. Cromosómico
	2. Génico
	3. Gonadal
Diferenciación secundaria	4. Hormonal
	5. Nervioso
	6. Genitales externo
	7. Genital externos
	8. Asignación-social

---

## Cromosómico

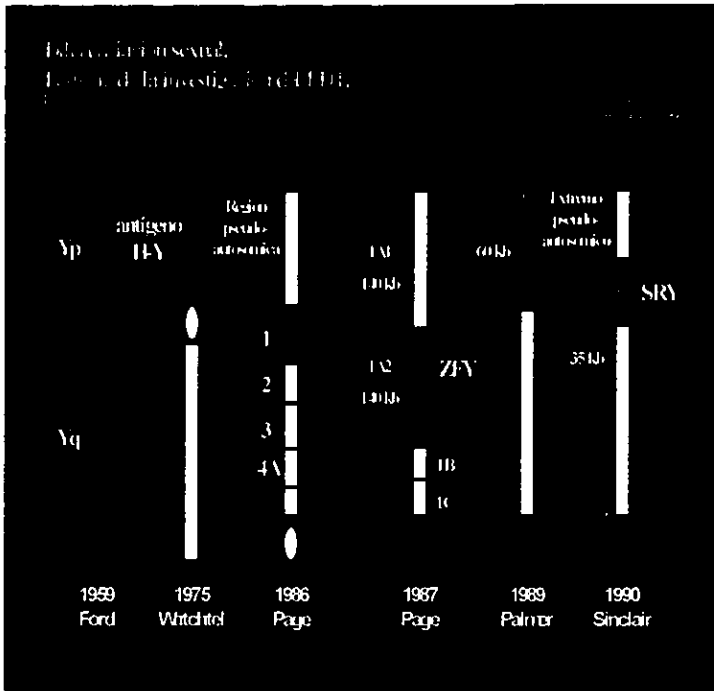
El desarrollo de un nuevo ser se inicia durante la fertilización, en el momento en que se presenta la anfimixis o mezcla de material genético de ambos padres, el espermatozoide aporta un cromosoma "X" o "Y", el óvulo sólo proporciona cromosoma "X" determinandose el sexo cromosómico, 46, XX para la mujer y 46,XY para el varón. Esto es sólo e inicio y no determina que se cumpla la meta final de la diferenciación sexual normal, ya que no es la presencia de los cromosomas sexuales, sino su contenido génico lo que asegura la dirección de la diferenciación sexual.

El embrión humano tiene capacidad sexual bipotencial o de dualidad primaria, esto significa que presenta los elementos y primordios anatómicos para ambos sexos. En la diferenciación femenina parecería ser la tendencia natural del embrión ya que aparentemente no requiere de estímulos específicos, comparativamente con la masculina que requiere de múltiples factores, para cubrir la cascada de eventos que lo llevan a la virilización.

## GENICO

Posteriormente a la fertilización, el cigoto, con el número normal de autosomas y cromosomas sexuales XX ó XY, pone en juego la actividad génica para que se lleve a cabo el desarrollo y la morfogénesis temprana del embrión. Algunas investigaciones señalan el papel fundamental de genes localizados en el cromosoma Y para la diferenciación sexual masculina. Page y cols., en 1987 identificaron en el brazo corto del cromosoma Y, una región de aproximadamente 140Kb, denominandola "ZFY". Esta secuencia génica está altamente conservada en diferentes especies y codifica para una proteína de dedos de Zinc que se une al ADN y regula su expresión. En 1990 Sinclair y cols. reconocieron una región de 35 Kb proxima a la región pseudoautosómica a la que denominaron SRY(región determinante sexual en el Y) que parecería llevar los requerimientos del factor determinante testicular (FDT), ya que en condiciones normales su función es necesaria para la diferenciación en el testículo de la gónada primitiva. Aunque el SRY es un gen maestro para esta diferenciación,

se requiere de la actuación de otros genes autosómicos para apoyar la diferenciación normal testicular.



## GONADAL

Hacia el día 24 del desarrollo embrionario, que corresponde al horizonte X de Streeter ( embrión de 2-3mm ) es posible reconocer las células germinales primordiales ( CGP ) o gonocitos de origen extragonadal, visualizandose inicialmente en el endodermo caudal de la vesícula embrionaria (saco vitelino ). Durante la 4a. o 5a. semana de desarrollo las CGP migran sobre la vesícula embrionaria y mesenterio dorsal hasta llegar al primordio gonadal constituido por 2 crestas longitudinales de mesodermo intermedio, denominadas urogenitales. La migración de los gonocitos se lleva a cabo por

procesos de translación, al crecer el intestino primitivo y, posteriormente, por movimientos activos ameboides iniciados previamente a su llegada a las crestas urogenitales en la región lumbar hacia el día 42 de desarrollo.

Se han realizado numerosos estudios sobre los mecanismos que controlan la migración de los gonocitos los cuales orientan a glucoproteínas de adhesión en la matriz extracelular, sugiriendo que la fibronectina tiene una función fundamental en este proceso.

Las CGP son células epiblasto-endodérmicas, indiferenciadas, voluminosas, esféricas, con núcleo prominente, citoplasma PAS-positiva y lípidos, mostrando una reacción positiva a la fosfatasa alcalina, lo que indica actividad metabólica, colonizando la gónada hacia la 5a. semana de desarrollo.

Entre las semanas 4a y 6a. las gónadas indioferenciadas o bipotenciales son histológica y anatómicamente indistinguibles como masculina y femenina. Estan representadas por las crestas urogenitales localizadas lateralmente al mesenterio dorsal e integradas al mesodermo intermedio. Su morfogénesis incluye la organización de los tejidos, dando así un epitelio engrosado en la superficie, denominado epitelio celómico ( EC) que corresponde a la región ventromedial de la cresta. Hacia la porción dorsal se diferencia el riñon mesonéfrico el cual también participa en la formación de la gónada. Las CGP, se incorporan a la cresta dirigiendose hacia el epitelio celómico, el cual pierde temporalmente la membrana basal, permitiendo el libre movimiento de las CGP y del epitelio dentro del blastema gonadal, generando agrupaciones celulares en forma de cordones. Estos contienen células somáticas-epiteliales y CGP identificandose como áreas tisulares densas inmersas en el mesénquima de la gónada hacia el cual se dirigen células del mesonefros.

La gónada indiferenciada se transforma en testículo, bajo la influencia del gen SRY localizado en el brazo corto del cromosoma Y. En la actualidad es indiscutible la participación de otros genes localizados en los autosomas, que son activados para apoyar significativamente el desarrollo gonadal como ya se mencionó con anterioridad.

Los testiculos son identificados morfológicamente desde la 6a. semana, cuando los elementos celulares se organizan para diferenciarse en tejido testicular. Es así, como la cresta gonadal integrada por mesénquima, epitelio celómico y células del mesonefros, que corresponden a las células somáticas y a las CGP ó gonocitos a las germinales, presentan una orientación y reacomodo

que permite identificar a la gónada masculina. Los cordones testiculares se ubican en la porción medular de la cresta, permitiendo que la zona cortical se diferencie en la túnica albugínea, cápsula de tejido conectivo que se proyecta al estroma testicular entre los cordones. Los cordones presentan células somáticas y germinales, las primeras se transforman en células sustentaculares ó de Sertoli y las segundas en proespermatogonias.

El mesénquima que separa a los cordones se diferencia en tejido conectivo o estroma testicular, donde se localizan las células de Leydig o intersticiales, aparentemente originadas de las células del mesonefros que se incluyen en la cresta genital.

Durante el segundo trimestre de la gestación, los cordones testiculares gradualmente desarrollan un lumen, apareciendo los tubos seminíferos con células alineadas periféricamente como son las células de Sertoli y las proespermatogonias.

Respecto al sexo génico, los embriones inicialmente presentan un estado indiferenciado de desarrollo sexual, marcado por gónadas bipotenciales y genitales externos e internos indeterminados sexualmente. Posteriormente en el embrión femenino, los conductos müllerianos dan origen a las trompas, útero, y 2/3 superiores de vagina, y en el embrión masculino los conductos de Wolff son precursores del epidídimo, conductos deferentes, vesículas seminales y conductos eyaculadores. En los varones, la determinación sexual culmina con la secreción de hormonas testiculares, mismas que causan desarrollo específico sexual de genitales internos y externos del varón; este proceso se conoce como diferenciación sexual primaria.

En ausencia de gónadas los embriones desarrollan genitales femeninos, así la diferenciación femenina es considerada como un proceso por omisión. Las reversiones sexuales en el varón pueden resultar de la ausencia de hormonas testiculares o de la falla de la señalización hormonal como señal en tejidos blancos. Contrariamente si los embriones femeninos son expuestos a hormonas testiculares pueden tomar el aspecto de la diferenciación sexual masculina, a pesar de la ausencia de testículos.

El entendimiento del desarrollo sexual masculino es mucho más extenso que el conocimiento del desarrollo femenino; básicamente por la presencia de tres moléculas testiculares que han sido identificadas. Hace algunas décadas, dos de éstas hormonas o

moléculas de diferenciación masculina fueron descubiertas con el desarrollo del experimento ahora clásico de trasplante de testículos de conejo fetal en un huésped femenino.

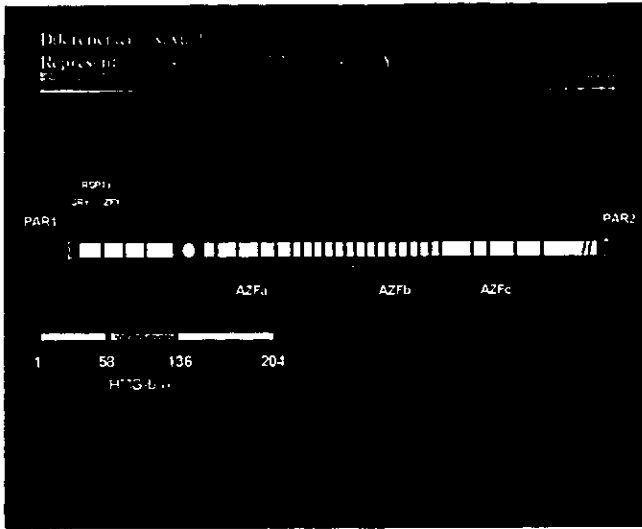
Las células de Sertoli secretan una hormona de la súper familia TGF- $\beta$  llamada sustancia inhibidora Mülleriana ( MIS) también conocida como antihormona Mülleriana [AMH +++ ), la cual causa regresión de los conductos Müllerianos.

La células de Leydig secretan testosterona, que mantienen los conductos de Wolff, así también la testosterona se metaboliza en otros esteroides que masculinizan los genitales externos y regiones específicas del cerebro.

Más recientemente, un tercera hormona ha sido identificada en ratones, en la célula de Leydig, llamada hormona semejante a la insulina ó 3 (InsL3) que se requiere para el descenso testicular.

Tres genes han sido implicados en el desarrollo gonadal el factor-1 de la esteriodogénesis (SF-1, o Ftz-F1), Wilms tumor 1 (WT1), y *el homeobox gene*, Lim-1.

El único gen conocido, específico al sexo que involucra directamente al desarrollo testicular es el gen ligado al Y (SRY) cuya expresión sigue al de SF-1, WT1 y LIM-1. Los genes autosómicos SOX 9, SF-1 y DMRT1 todos muestran un patrón de expresión de dimorfismo sexual aún después del inicio de la determinación testicular, aunque la expresión del SF-1 resurge en el ovario postnatal. El DMRT1 es el único gen conocido que participa en la diferenciación sexual en vertebrados e invertebrados. Wnt4 esta implicado en el desarrollo ovárico debido al papel que juega en la represión de la esteroidogénesis.

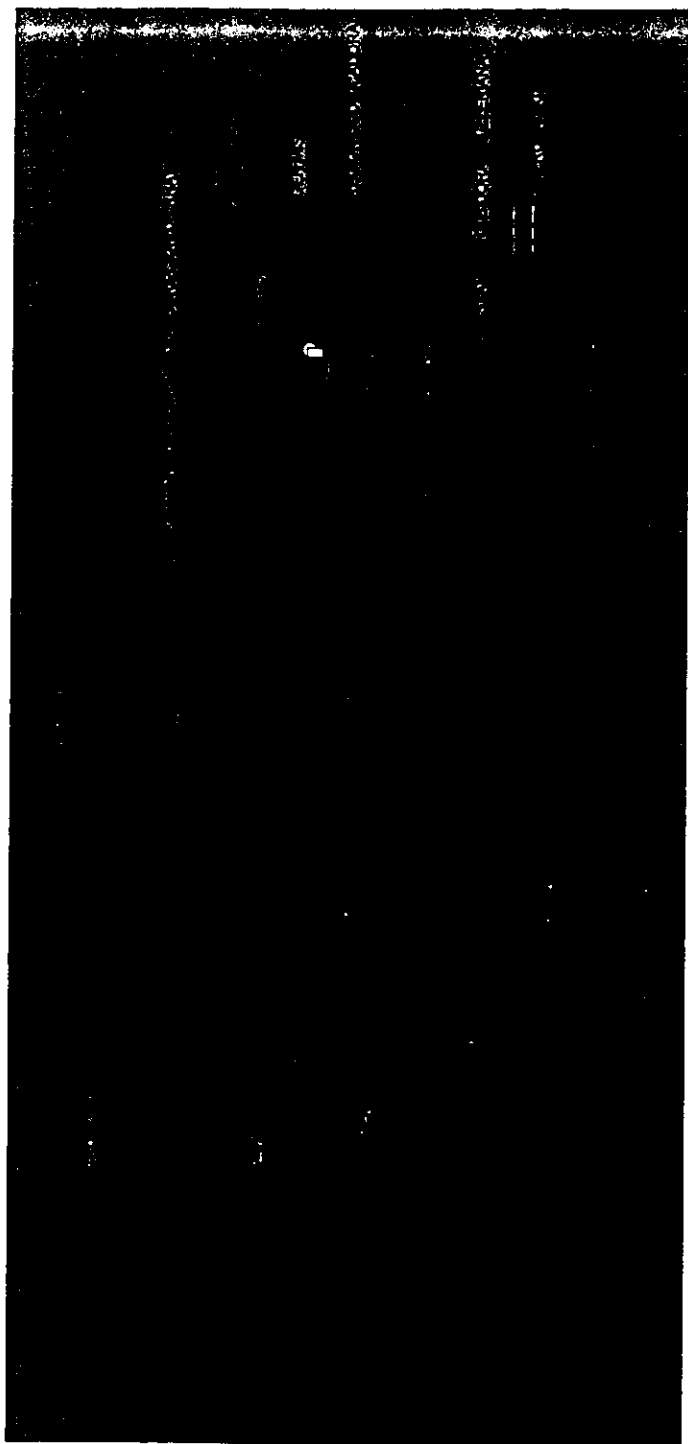


Un gen SRY codifica una proteína que dispara la organogénesis testicular y se asegura del desarrollo del fenotipo masculino. Coincidente con el continuo mejoramiento en las técnicas de cultivo celular y los notables avances en la biología molecular y celular, y el conocimiento de las clásicas hormonas gonadotrópicas y androgénicas diversas, es posible saber que diversas familias de moléculas pueden actuar como proteínas reguladoras de la organogénesis testicular, desarrollo del fenotipo masculino, e iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis.

De particular significancia es el rol de la proteína codificada por SRY, siendo un factor de transcripción nuclear. La proteína SRY contiene aminoácidos altamente conservados para la unión con el ADN y zinc-dedos (Zinc-Finger), conocido como la caja de HMG, (the High Mobility Group Proteins), que reconoce un sitio discreto de región reguladora ascendente de ambos, tanto para el gen de la sustancia inhibitoria Mülleriana (MIS) como para el gen aromatasa citocromo P<sub>450</sub>, así como también para otros genes. Por lo que es conveniente determinar el efecto y participación de los autosomas a partir de la región SRY como se describe a continuación:

El gen MIS es expresado por las células fetales de Sertoli tan pronto como se desarrollan los cordones testiculares, y es responsable de la regresión de los conductos primordiales Müllerianos en los embriones





masculinos; Por otra parte, el gen de la aromatasa citocromo P<sub>450</sub>, es responsable de la conversión de testosterona a estradiol. La testosterona es necesaria para el desarrollo de los conductos Wolffianos originados simultáneamente al desarrollo de los conductos Müllerianos los cuales son inhibidos por la expresión del gen MIS de las células de Sertoli.

Se ha propuesto que la proteína SRY es un disparador maestro que simultáneamente dirige la expresión del gen MIS y la represión del gen de la aromatasa del citocromo P<sub>450</sub>. Por este mecanismo, la proteína SRY permite el desarrollo femenino autónomo hacia el fenotipo masculino.

Aunque el gen del SRY aporta una imagen coherente de cómo se desarrollan los órganos masculinos en forma específica y como el desarrollo femenino es inactivado, el entendimiento de cómo las células germinales y somáticas que interactúan en el desarrollo testicular y durante la espermatogénesis esta menos definido.

### **Desarrollo y maduración espermática.**

El largo recorrido de las primeras células germinales de origen endodérmico, desde la porción caudal del saco vitelino junto al alantoides, denominadas células germinales primordiales (PGCs), que en respuesta al factor celular-iniciador soluble, migran a la gónada indiferenciada colonizándola aproximadamente en la 5ª. Semana del desarrollo. (8). Las PGCs después de diferenciarse en proespermátogonia permanecen en un estado quiescente en los túbulos seminíferos del testículo y en etapa fetal se diferencian en espermatogonias presentando multiplicación y deteniéndose al nacimiento.

La estimulación gonadotrófica al inicio de la pubertad induce la espermatogénesis que incluye la división meiótica generada por la pérdida del factor inhibidor de Müller que funciona como inhibidor de la meiosis y posteriormente el evento de la espermiogénesis o espermiotelirosis (diferenciación de la célula espermática, de una espermátide redonda a espermia flagelado). La metilación de los genes impronta genómica sucede entre los estados de espermatogonias y de espermatocito que implica la expresión genética de origen parental y

que es un mecanismo regulador de la expresión genética desde etapa de gametogénesis (9). Durante el último estadio de la espermatogénesis, el núcleo se acorta y condensa, proteínas básicas no histonas semejantes a protaminas, sustituyen las histonas típicas que se asocian con el ADN nuclear, y la actividad transcripcional es reprimida en la espermátide, y su estructura nucleosomal se pierde (10). Al mismo tiempo el citoplasma restante es desechado como una gota citoplasmática; y así los espermatozoides resultantes entran a la luz tubular. Finalmente, las células espermáticas son trasladadas al epidídimo, en donde son almacenadas, y adquieren motilidad para ser transportadas hasta la eyaculación del tracto reproductor masculino (11).

Los últimos pasos de la espermatogénesis, se llevan a cabo cuando los espermias son liberados a la luz tubular, sus ribosomas son casi ausentes, y su retículo endoplásmico se ha perdido del citoplasma. La morfogénesis del espermatozoide es completada en los tubos seminíferos en la porción contorneada, sin embargo los espermias testiculares continúan fisiológicamente inmaduros. Como no tienen modo de producir proteínas, todos los factores que los espermias requerirán para ascender en el tracto reproductivo femenino tienen que ser sintetizados y almacenados previamente, o deben ser provistos del exterior por las células de la cauda del epidídimo.

Durante su trayecto, los espermatozoides de los mamíferos se someten a maduración epididimaria, pero continúan imposibilitados para fertilizar ovocitos hasta el paso preparatorio final llamado "capacitación espermática", que ocurre cuando los espermias han permanecido en el tracto genital femenino por algún tiempo. Este proceso poco conocido a la fecha aparece como algo necesario para que los espermias lleven a cabo la transición morfológica y fisiológica (la reacción acrosomal) una vez que ellos han contactado con la zona pelúcida del ovocito.

El acrosoma, o aparato de Golgi es una estructura como película que recubre la porción anterior del núcleo espermático, contiene múltiples enzimas hidrolíticas que son liberadas por exocitosis previo a la fertilización entre ellas se encuentra la Acrosina, Tripsin-like y la Hialuronidasa entre otras. Simultáneamente infinidad de cambios ocurren en todos los compartimentos espermáticos (cabeza, flagelo, membrana, citosol, y citoesqueleto). Factores originados de los fluidos epididimarios y del plasma seminal son perdidos o

redistribuidos, y los lípidos y proteínas de la membrana son reorganizados, además mecanismos complejos de señales de transcripción son iniciados (11).

## **MARCO TEORICO**

Con el advenimiento de la fertilización in-vitro (IVF) y la inyección espermática intra citoplasmática (ICSI) se ha abierto la puerta de la fertilidad para muchas parejas quienes no eran candidatos a concebir por otros medios.

El objetivo particular de estas técnicas es apoyar a parejas donde el varón tiene una baja concentración espermática asociada a testiculopatía o alteraciones en la espermatogénesis.

Con la aplicación de estas técnicas y la programación de estudios en los varones con infertilidad se ha podido obtener mayor información y profundizar sobre la etiología o bien obtener evidencias de su infertilidad por causas génicas o cromosómicas en estos varones.

Recientemente se ha hecho más evidente que puede haber población de varones infértiles con constitución cromosómica-génica normal, pero que poseen anomalías genéticas confinadas a la línea celular germinal y en quienes dichas anomalías solo pueden ser detectadas por valoración espermática ( Mosaicismo Gonadal).

Antes del advenimiento de técnicas de reproducción asistida como IVF o ICSI, la búsqueda de tales anomalías era meramente de interés académico, actualmente con el conocimiento de que estos defectos pueden transmitirse a las siguientes generaciones obtenidas de la fertilización asistida, por lo cual existe la necesidad de que los médicos que manejan infertilidad tengan un buen entendimiento de la genética reproductiva masculina, para a su vez obtener una valoración genética previa a su consejo reproductivo.

## **FACTORES GENETICOS DE RIESGO O LIMITANTES PARA LA REPRODUCCIÓN MASCULINA**

### **ANORMALIDADES CROMOSOMICAS EN EL VARÓN**

Las anomalías cromosómicas en sangre periférica son más comunes en hombres infértiles y entre las parejas en búsqueda de ICSI comparado con la población en general. En un Metanálisis de 11 publicaciones, de 9766 varones infértiles (12), se encontró una incidencia de 5.8% en anomalías cromosómicas. De estas, las anomalías cromosómicas ligadas al sexo representaban 4.2% y las anomalías autosómicas 1.5%.

Comparando la incidencia de anomalías cromosómicas con otro Metanálisis que conjuntó a 94,465 recién nacidos varones, se detectaron en el 0.38% y de estos 0.14% fueron anomalías cromosómicas y 0.25% fueron anomalías autosómicas (13).

En una población de 781 varones de parejas sometidos a ICSI, 3.8% presentó anomalías cromosómicas; el 1.2% con aberraciones del cromosoma sexual y 12.6% con anomalías autosómicas (14).

### **ANORMALIDADES DEL CROMOSOMA SEXUAL.**

Un cromosoma Y extra es compatible con el desarrollo y el más común de estos desordenes es el síndrome Klinefelter 47,XXY.

#### **Síndrome de Klinefelter y sus variantes (47,XXY. mosaicismo 46,XY./47,XXY.)**

El síndrome de Klinefelter es la anomalía cromosómica ligada al sexo más frecuente, que ocurre en el 0.07% de los varones recién nacidos con cariotipo. De un análisis citogenético realizado a 94,465 recién nacidos (13). En varones Azoospermicos la prevalencia del síndrome de Klinefelter se ha encontrado en aproximadamente 10% en los países occidentales (15) y 7.5% entre los varones japoneses (16).

Los adultos varones con síndrome de Klinefelter tienen testículos pequeños y firmes debido usualmente a ausencia y/o disminución de las células germinales. Esto debe ser diferenciado de los varones con otras causas de daño a la espermatogénesis quienes tienen testículos suaves y pequeños. El fenotipo puede variar desde un hombre con virilización normal hasta uno con estigma de deficiencia de andrógenos, incluyendo distribución femenina del vello y/o escaso vello corporal (17).

La función de las células de Leydig habitualmente se encuentra dañada por lo cual los niveles de testosterona pueden estar altos o bajos, el estradiol normal o incrementado, y la hormona folículo estimulante aumentada (18). Sorprende, que la libido en estos pacientes se encuentra en rangos normales a pesar de los niveles bajos de testosterona, pero con la edad regularmente pueden necesitar reemplazo de andrógenos.

En una serie de 147 varones con síndrome de Klinefelter puro 47,XXY. determinado por cariotipo en sangre periférica (16), solo un varón se encontró espermatozoides en el eyaculado; en este caso se repitió el cariotipo y no fue posible identificar mosaicismo.

Si esta experiencia es clásica, los hombres con síndrome de Klinefelter, pueden ser aconsejados a que el pronóstico de captura espermática para IVF e ICSI es muy pobre. De cualquier manera, hay reportes de obtención de espermatozoides maduros de varones con aparente síndrome de Klinefelter puro (19).

En muchos centros de fertilidad los varones con síndrome de Klinefelter están siendo propuestos para biopsia y aspiración testicular, aunque es necesario tener información adicional para conocer las probabilidades de éxito, especialmente en aquellos en quienes los métodos modernos han fallado para identificar bajos niveles de mosaicismo.

Los varones con mosaicismo de Klinefelter 46,XY./47,XXY. tienen presencia variable de células germinales así como de producción espermática. Antes del advenimiento del IVF y del ICSI esto representaba solo escolástica; pero hoy en día es importante diagnosticar mosaicismo, ya que algunos espermatozoides obtenidos pueden esperarse normales y ser utilizados para fertilización.

La producción de espermatozoides 24, XY. ha sido reportada en .9% (21) a 2.1% (22) de varones con mosaïcismo de Klinefelter, y en 1.36-25% de varones con cariotipo 47,XXY (23). puro. Estos hallazgos indican que algunas células 47, XXY. son capaces de alcanzar la meiosis y producir espermatozoides maduros. Actualmente no se ha logrado saber si estos espermatozoides haploides en el síndrome de Klinefelter son siempre el resultado de clonación de una célula normal en una población de mosaïcismo o si en algunas circunstancias las células germinales masculinas 47,XXY. son viables y capaces de producir espermatozoides haploides

El estudio y análisis de células preimplantación con técnica de Hibridación in-situ fluorescente (FISH), puede utilizarse para confirmar la normalidad (20).

### **Anormalidades de cromosomas sexuales en recién nacidos concebidos a través de inyecciones espermática intracitoplasmática (ICSI) .**

Hay reportes controversiales que indican una mayor frecuencia de anomalías cromosómicas sexuales en niños concebidos a través de ICSI, comparado con la población normal.

El mecanismo implícito no está bien dilucidado, pero existen muchas aseveraciones discutidas y aún no concluyentes en la literatura; como ejemplo se incluiría el mosaïcismo de Klinefelter con una línea celular aneuploide confinada a la célula germinal y no detectable en cariotipo de sangre periférica (28).

Además, se ha sugerido (29) que la presencia de mutaciones en células germinales solo puede surgir si la mutación inicia en la masa celular extra-embriónica antes que las células germinales primordiales migren de regreso al embrión.

Otra explicación es la producción de espermatozoides diploides 47XY; hallazgo reportado en espermatozoides de varones con oligozoospermia severa con cariotipo normal (30). Una tercera posibilidad es que debido a los bajos niveles de mosaïcismo puede ser omitido durante el cariotipo de rutina.

**47,XYY.:** Una anomalía rara y comúnmente asociada con análisis espermático aparentemente normal.

Los varones con 47,XYY. son vistos más frecuentemente en la población infértil que en la población general. Un estudio reciente comparó 10,000 espermatozoides de un varón 47XYY vs. 500,000 espermatozoides de 18 donadores normales usando FISH de doble color para cromosoma 13 y 21 y FISH de triple color para el cromosoma sexual (31). Encontrando que había un incremento significativo en la frecuencia de disomía 13 y X e Y en el espermatozoide del varón 47,XYY. Sin embargo dos estudios previos de espermatozoides de varones con 47,XYY. uno usando hibridación in-situ (22) y otro usando FISH (32), muestran que la mayoría de espermatozoides eran normales.

## **ANORMALIDADES DE LOS AUTOSOMAS:**

Usualmente los desordenes autosómicos no causan infertilidad en forma aislada, pero pudiese existir reducción en la espermatogénesis como consecuencia de una alteración más general en el fenotipo; presentándose más anomalías autosómicas en la población de varones con Azoospermia no obstructiva u oligospermia severa (33,34). Los pacientes con tales problemas usualmente recurren al médico debido a otras anomalías en el desarrollo, y no se presentan de novo por infertilidad.

Sin embargo, en vista del número de casos de estos desordenes en el varón con concentraciones espermáticas bajas, sería apropiado solicitar cariotipo a quienes estén propuestos para ICSI y consejo genético, cuando alguna anomalía sea descubierta. El cariotipo puede ser normal pero esto no excluye defectos genéticos, por lo cual es necesario que los pacientes y el personal médico que manejan infertilidad conozcan la limitación del cariotipo.

Los varones quienes saben tener un defecto autosómico pueden llegar a solicitar el ICSI y en estos casos el consejo genético es necesario para informar las condiciones genéticas reales así como implicaciones reproductivas.

## **GENOPATIAS ( MUTACIONES)**

Las alteraciones en la secuencia de bases del DNA son llamadas Mutaciones. Aunque las mutaciones pueden ocasionalmente ser



benéficas y preservarse en la evolución, estas comúnmente resultan en una función genética defectuosa. Se ha postulado que muchas mutaciones ocurren en el testículo durante la espermatogénesis y que la ubicación externa de los testículos en los mamíferos disminuye el índice de mutación (35).

## **Desordenes Genéticos ligados al X y Fertilidad Masculina**

Todo varón tiene solo un cromosoma X; por lo tanto los desordenes recesivos y ligados al X se manifestará en los varones y el defecto será transmitido a través de sus hijas a sus nietos.

### **Síndrome de Kallman**

En la practica de infertilidad el síndrome de Kallman es el desorden más común ligado al X, y el más común de estos es la forma recesiva ligada al X causada por una mutación en el gen KALIG-1 en el Xp22.3 (36). Este gen esta relacionado con la regulación de la adhesión celular y axonal.

Los pacientes con síndrome de Kallman tienen hipogonadismo hipogonadotrófico y pueden tener otras alteraciones clínicas como anosmia, asimetría facial, daltonismo, sordera, alteraciones renales y criptorquidia. Otras formas raras del síndrome de Kallman han sido descritas, incluyendo una forma autosómica dominante (37) y otra autosómica recesiva. Es importante hacer notar que algunos varones con síndrome de Kallman tienen un deficiencia aislada de gonadotropina sin alguna otra anormalidad fenotípica, y estos hombres pueden algunas ocasiones presentarse de novo con infertilidad, y que con terapia hormonal de reemplazo su pronóstico reproductivo es bueno.

### **El Gen Y e Infertilidad Masculina**

En 1992 se reportó a tres varones con daño severo en la espermatogénesis y análisis cromosómico aparentemente normal, pero en quienes las pruebas moleculares revelaron microdeleciones en el brazo largo del cromosoma Y(38,39).

El primer reporte se hizo por Tiepolo y Zuffardi (40) quienes describieron varones con azoospermia y deleciones en el brazo largo

del cromosoma Y, en el intervalo 6 con pérdida de todo el material genético distal. Posteriormente se han publicado numerosos estudios de series de casos, y es claro que a pesar de que estas microdeleciones pueden ocurrir en la población fértil, tiene más prevalencia en la población infértil (42).. A la fecha la lista de microdeleciones es muy larga, pero existen reportes preliminares de deleciones mucho más pequeñas. Estas microdeleciones han sido encontradas en tres regiones del cromosoma Y y se han denominado AZFa, AZFb, y AZFc (41). La parte proximal de la microdelección AZFc en ocasiones se denomina AZFd. Un sin número de genes involucrados se han descrito, y estos genes incluyen RBM (43), DAZ, DFFRY (44), DBY y CDY.

La anomalía más comúnmente reportada en la literatura es una microdelección en la región AZFc que abarca el gen DAZ. Sin embargo no hay una correlación exacta entre las deleciones DAZ y la presencia o ausencia de la espermatogénesis, *pero esto puede ser por el gen DAZ, hay igualmente una copia autosómica.*

Existe el reporte de un hombre con daño severo en la espermatogénesis quien tenía una expresión del DAZ en sangre periférica pero con ausencia de la expresión del DAZ en el testículo (45).

## Genes DAZ y RBM

El primer gen postulado para la espermatogénesis es nombrado como RBM (RNA-binding MOTIF). Determinándose una familia de más de 50 genes RBM (46) y la mayor parte de las copias son probablemente inactivas; y deleciones de la región AZFb producen inactivación funcional del RBM.

El gen DAZ (conocido como SPGY) fue el segundo gen descrito. Inicialmente se pensó como gen único (47), pero ahora se conoce como miembro de una familia de 6 a 10 genes (48,49).

Ambas familias de los genes DAZ y el RBM codifican proteínas con una estructura similar, que están probablemente involucradas en el metabolismo del RNA.

El RBM es una proteína nuclear y su expresión se restringe a la línea germinal masculina en humanos y en ratones; y la proteína DAZ es citoplasmática. Además están relacionadas con diversos grupos de proteínas nucleares conocidas como hnRNPG

(heterogenous nuclear RNA ribonucleoprotein G) y vinculadas con el metabolismo del RNA, incluyendo empaquetamiento del RNA, empalme y transporte al citoplasma; sin embargo, el hnRNPG codifica autosómicamente y con expresión ubicua, indicando una función necesaria para todo tipo de células (50,51). El RBM regula los eventos de empalme proteínico esenciales para la espermatogénesis (52), en cuanto al DAZ su contribución autosómica es importante para la gametogénesis en ambos sexos, y tal vez en el varón para la regulación en la represión de la traducción durante la espermatogénesis.

El RBM es un gen altamente conservado y ha sido encontrado en los cromosomas Y de todas las especies de mamíferos estudiados (53), incluyendo a los marsupiales y esto sugiere que el RBM deriva del hnRNPG de al menos hace 130 millones de años (54).

El DAZ se encuentra solo en humanos y primates del viejo mundo, pero un homólogo autosómico está presente en los mamíferos y se ubican en el cromosoma 17 en los ratones. El ratón femenino sin el gen de DAZ tiene una falla en el desarrollo del tracto genital femenino.

Este homólogo autosómico está presente también en los humanos en el cromosoma 3p24 (55), y puede influir en la espermatogénesis en varones con deleciones en el AZFc. También es posible que ese defecto en el gen autosómico DAZ pueda ser la explicación para algunos casos de infertilidad femenina asociada con Amenorrea Primaria. La proteína DAZ se expresa solo en células germinales femeninas y masculinas en ratones y hombres, y estas observaciones han permitido sugerir que el DAZ puedan ser adquiridos de sus respectivos homólogos autosómicos durante el curso de la evolución y esos genes asociados con la espermatogénesis tiendan a acumularse en el cromosoma Y.

Hay un número considerable de secuencias idénticas entre el cromosoma X y el Y y se ha postulado que ha habido inactivación de los genes del X, preservándose las copias activas en el cromosoma Y (56,57).

### **Implicaciones Clínicas de Microdeleciones en el Y.**

No existen reportes aún reportes en que los varones con microdeleciones tengan ninguna anomalía fenotípica, además de la espermatogénesis anormal, y los hombres con microdeleciones son perfectamente sanos en todo lo restante (41,47).

Como hay un solo cromosoma Y, se predijó la posibilidad de que las microdeleciones en Y en el varón serían transmitidas a sus hijos. Sin embargo, son bajas las probabilidades en la población normal sin un manejo a base reproducción asistida (FIVTE, ICSI).

Muchos reportes han confirmado que esta transmisión es una realidad. Esto puede ser importante porque la microdelección que aparezca puede ser tan grande en el hijo como en el padre. Aunque se hace necesaria la información del binomio padre-hijo con cuenta espermática muy baja, y que este sea producto de ICSI de espermatozoides con padre portador de microdeleciones; y para obtener la es importante un seguimiento a largo plazo. Sin embargo es preferible obtener información acerca del estado genético de los bebés resultado de ICSI, hay un cuestionamiento ético en si los bebés deben ser valorados tempranamente y de ser así si los resultados de las pruebas podrían ser confiables

### **Pruebas para Identificaciones en el Y**

Las pruebas para las microdeleciones hoy en día se han propuesto y realizado en las unidades de IVF e ICSI, pero no se encuentra aún metodológicamente estandarizado y por lo tanto es difícil de hacer una comparación directa entre los diferentes resultados reportados. Muchos centros han desarrollado sus propios métodos de búsqueda (41,58).

Como no hay correlación entre la histopatología y la delección del DAZ, es prematuro aún depender de pruebas genéticas específicas porque podrían fallar para detectar una proporción de microdeleciones en varones infértiles. En un estudio para comparar resultados de 28 laboratorios Europeos (59) diferentes se concluyó que el uso de un alto número de cartillas no mejoró la eficacia de los resultados, la conclusión sería tratar de lograr la estandarización de los métodos tanto de detección clínica como de laboratorio. Hoy en día existen Kits comerciales de pruebas; sin embargo el uso de pruebas en sangre periférica pueda no ser confiable.

La carencia del mensajero de RNA del DAZ en células testiculares se ha reportado en hombres con aparente normalidad en la constitución del gen DAZ en la extracción de DNA de leucocitos (45). Estos hallazgos pueden ser explicados por delecciones tan pequeñas que no sean reconocidas abarcando las copias activas del DAZ, mosaicismo o anomalías en la transcripción del DAZ.

## **Consejo a las parejas en las que el varón tiene de lesión en el Y.**

¿Que consejo podría darse a los pacientes?\*\*\*\*\*

No hay lugar para las pruebas para los varones con micro de lesiones en los que se usa ICSI para resolver la azoospermia , porque en estos hombres la espermatogénesis debe ser normal.

Para otros varones con daño severo en la espermatogénesis, las pruebas para microdeleciones antes del ICSI son recomendables, sin embargo debido a que en estos hombres y sus hijos varones sería poco probable tener anomalías fenotípicas además del daño en la espermatogénesis, es razonable tomar en cuenta el costo y las limitaciones en los métodos actualmente utilizados como pruebas de escrutinio, mismas que deben ser discutidas con la pareja. Si un hombre con microdeleciones y su pareja desean continuar con el ICSI, ellos deben ser aconsejados en que las microdeleciones serán transmitidas a sus hijos varones pero no a sus hijas, y no esta bien establecido si el hijo quien hereda una microdelección tendrá problemas de fertilidad.

Además la pareja debe ser informada que no hay evidencia de otras consecuencias en la salud por las microdeleciones.

En un estudio de las decisiones que toman actualmente las parejas en Bélgica (60) y en los países bajos se encontró que la mayor parte optan por proceder con ICSI, pero el 21% se abstiene del tratamiento o deciden inseminación con semen de donador y esto fue fuertemente influenciado por la opinión del consejero.

## **Mutaciones para la fibrosis quística e infertilidad en el varón.**

La fibrosis quística es un desorden autosómico recesivo. Es la enfermedad genética más común entre los caucásicos; en los cuales 1 de cada 25 son portadores de la mutación del gen involucrando con los reguladores de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR). Este gen, localizado en el brazo corto del cromosoma 7, codifica para una proteína de membrana que funciona como un canal de iones y que también influye en la formación de los conductos eyaculadores, vesículas seminales, conductos deferentes y dos terceras partes distales de el epidídimo. La ausencia congénita

bilateral de los conductos deferentes (CBAVD) se asocia con la mutación en el gen CFTR, y es encontrado aproximadamente en el 2% de los pacientes con azoospermia obstructiva atendidos en una clínica de Edimburgo (61). Sin embargo, la incidencia en varones con azoospermia obstructiva puede variar en los diferentes países dependiendo de la prevalencia en la mutación de fibrosis quística y de la prevalencia de otras causas de obstrucción.

En aquellos países con alta prevalencia de infecciones de transmisión sexual el CBAVD como causa de azoospermia será relativamente infrecuente comparado con la azoospermia asociada a epididimitis postgonocócica. Sin embargo, los hallazgos clínicos de ausencia de Vas deferens de fácil de omitir, por lo que todos los varones con azoospermia deben ser examinados muy cuidadosamente para excluir CBAVD, particularmente si el análisis seminal revela azoospermia asociado a volumen seminal menor de 1.0 ml, y con pH < 7.0.

En años recientes el incremento en el número de mutaciones en el gen CFTR se ha caracterizado, y más de 400 se han descrito (62). Se han publicado al menos 17 series de varones con CBAVD en quienes se probó para varias mutaciones. En estudios más recientes (61,63) los índices de detección han sido mayores (75-81%), mientras los índices de detección en publicaciones más viejas ha sido al rededor del 40%.

En una revisión de 449 varones con CBAVD (64) la mutación delta F508 fue detectada en 244 de ellos, la mutación R117H en 54 varones y la mutación W1282X en 37 varones. Otras 63 mutaciones fueron detectadas entre 1 a 9 varones, pero no todas las mutaciones fueron probadas para toda la serie de casos. Esto significa, que entre más mutaciones son definidas y probadas, la proporción de varones con CBAVD quienes son encontrados que cuentan con la mutación se aproximará al 100%.

Actualmente no está justificado probar para todas las mutaciones, porque muchas de ellas tienen baja prevalencia en una población en particular, y en la mayor parte de los lugares las pruebas se restringen a 20 a 30 mutaciones a las que ocurran más comúnmente en esa población.

En las mutaciones pueden ser encontradas en ambas copias del gen CFTR, pero en la mayor parte los varones con CBAVD se encuentra solo en una copia. En algunos de estos se suponen casos heterocigotos, donde puede existir una segunda mutación desconocida, pero hay también otro mecanismo de interés. En más del 63% de estos, una variante del DNA, el alelo 5T puede ser identificado en una región de codificación para el gen CFTR (65) y se

ha confirmado esta observación en diversos pacientes. Adicionalmente resta mucho trabajo para entender la genética del CBAVD; por lo cual será importante a futuro dar seguimiento a los niños concebidos a través de ICSI de cuyos padres tengan CBAVD y sean también heterocigotos u homocigotos.

Existen reportes de la mutaciones del CFTR en varones con oligozoospermia severa pero con conductos deferentes, y esto ha postulado que el complejo CFTR pueda ocasionalmente afectar sólo la espermatogénesis (66). Aunque la relación entre la ausencia de conductos deferentes y la mutación del CFTR cada vez se establece más, el rol de esta mutación en los defectos de la espermatogénesis es aún incierta.

### **OBJETIVO PRINCIPAL:**

Realizar un análisis descriptivo de las características seminales, hormonales, y ultrasonográficas testiculares de los pacientes enviados al departamento de Genética para la realización de cariotipo por presentar oligozoospermia, astenozoospermia ó teratozoospermia de moderada a severa.

### **MATERIAL Y METODOS:**

Se realiza análisis descriptivo retroelectivo de 17 casos de pacientes enviados a valoración al departamento de Genética

### **CRITERIOS DE INCLUSION:**

- \* Edad de 18 a 45 años
- \* Pacientes con los siguientes diagnósticos:
  - AZOOSPERMIA
  - CRIPTOZOOSPERMIA
  - OLIGOZOOSPERMIA MODERADA -SEVERA
  - ASTENOZOOSPERMIA MODERADA-SEVERA
  - TERATOZOOSPERMIA MODERADA A SEVERA
- \* Espermocultivo negativo
- \* Sin mejoría espermática postratamiento antimicrobiano y/o terapéutico (p.e. Nolvadex, menotropinas, etc).

## **CRITERIOS DE EXCLUSION :**

- \* Con patología metabólica agregada ( p.e. Diabetes Mellitus, Hipotiroidismo)
- \* Diagnóstico de Eyacuación Retrógrada
- \* Pacientes con Azoospermia /Oligozoospermia Obstructiva

Todos los pacientes fueron valorados por la Clínica de Andrología y Genética en forma rutinaria: Biometría hemática, Química sanguínea (Glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos), perfil hormonal (hormona luteinizante, hormona foliculoestimulante, testosterona fracción libre, estradiol, prolactina y perfil tiroideo en los pacientes de oligozoospermia), ultrasonido testicular, espermocultivo y cariotipo),

## **RESULTADOS:**

6 pacientes presentaron oligoastenoteratozoospermia, 5 pacientes con astenoteratozoospermia, 5 pacientes con teratozoospermia y 1 paciente con astenozoospermia.

El promedio de edad fue de 30.5 años ( rango de 22-38 años); 16 pacientes tenían Esterilidad Primaria con un X de 6.6 (rango de 2 a 14 años), 1 sólo paciente con Esterilidad Secundaria de 6 años.

## **PERFILES HORMONALES**

Hormona luteinizante X  $5.66 \pm 2.49$ , hormona foliculoestimulante X  $6.06 \pm 3.41$ , testosterona fracción libre X  $18.3 \pm 8.78$ , estradiol X  $37.6 \pm 17.6$  y prolactina X  $7.81 \pm 2.05$ . El grupo presenta inversión de la relación FSH/LH de 1.07, sugestivo de falla testicular incipiente.

## **ULTRASONIDO TESTICULAR:**

Los volúmenes testiculares medidos ultrasonográficamente son: Testículo derecho X  $17.36 \pm 5.64$  , Testículo Izquierdo X  $18.46 \pm 6.51$ , diferencia testicular X  $2.69 \pm 1.17$ .



## **ANÁLISIS SEMINAL (OMS)**

Volúmen X  $2.02 \pm 0.88$ , concentración espermática X  $90.1 \pm 67.4$ , movilidad tipo A= 0, movilidad tipo B X  $32 \pm 20$  y morfología X  $20.44 \pm 13.07$ .

Ningun paciente tuvo factor inmunológico positivo.

## **ANÁLISIS DE RESULTADO**

El estudio de perfil hormonal se practicó en 17 pacientes, 14(82.35%) presentaron estudio citogenético normal, y 3(17.64%) anormales, reportándose en dos casos mosaicismo de sexocromosomas y uno con translocación robertsoniana (13;14). ( Cuadro 1 Grafica 1).

Los resultados del perfil hormonal en los pacientes 1,2,3,6,8,9 que corresponden a 6/14 (42.85)% presentan inversión FSH/LH con normogonadotropismo que sugieren una probable falla testicular incipiente e idiopática que pudiese ser la causa de alteración en la espermatogénesis (Cuadro 1). Sin embargo, los pacientes 1 y 3 presentan hipotrofia testicular bilateral, el 6 y 9 con hipotrofia unilateral izquierda y el 2 y 8 con volúmenes testiculares normales. El 1,2,6 y el 9 no presentaron ninguna patología intraescrotal agregada. En cambio el 3 presenta quistes bilaterales del epidídimo y el 8 epididimitis bilateral con hidrocele bilateral. (Cuadro 3).

En los pacientes 4,5,7,10,11,12,13 y 14 que corresponden a 8/14 (57.14%), no presentaron inversión FSH/LH y son normogonadotrópicos; llama la atención el reporte de hallazgos de patología intraescrotal en los pacientes 4 y 12, que presentan quistes unilaterales en epidídimo, el 10 varicocele unilateral, el 13 y 14 epididimitis e hidrocele bilateral, y el 11 con microcalcificaciones testiculares, epididimitis unilateral e hidrocele bilateral; y el paciente 7 normal. Solo en un caso (el paciente 5) presenta hipotrofia testicular bilateral sin hallazgos intraescrotales. De los pacientes con citogenética anormal (pacientes 15,16 y 17) el volumen testicular fue normal (paciente 17 con alteración robertsoniana 13;15 ), y en los pacientes con mosaicismo para sexocromosomas, el paciente 16 con hipotrofia bilateral y el paciente 15 con hipotrofia unilateral testicular; sin embargo al comparar los volúmenes testiculares de pacientes con cariotipo normal y los de mosaicismo se evidenci

Los parámetros seminales en el grupo de pacientes con cariotipo normal fueron, pacientes 3,4,6, y 8 presentaron oligoastenoterazoospermia, (resultado esperado en los pacientes 3,6 y 8 que tuvieron datos de falla testicular incipiente, el paciente 13

presenta oligoastenozoospermia, los pacientes 2,7,10,11,y 14 presentaron astenoteratozoospermia los pacientes: 10 con varicocele , 11 y 14 epididimitis que podrían justificar los parámetros seminales existentes ; los pacientes 1,5 y 9 presentaron teratozoospermia ( el 1 y 9 tuvieron datos hormonales de falla testicular incipiente y el 5 hipotrofia testicular bilateral; por lo cual el hallazgo seminal es justificable y además de que los 3 pacientes no coexistió patología intraescrotal agregada) .

El paciente 12 presentó astenozoospermia severa y tuvo como patología intraescrotal agregada quiste unilateral epididimario ( el cual no justifica el grado de severidad de la alteración seminal).

Los pacientes con alteración en el caritipo el paciente 15 con alteración robertsoniana presentó teratozoospermia, el paciente 16 con cariotipo 46XY/47 XYY presentó oligoastenoteratozoospermia ( con hallazgos intraescrotales de varicocele bilateral y quiste de epidídimo izquierdo ), el paciente 17 con alteración 46XY/45X0 presentó sus parámetros seminales dentro de lo normal pero en límites inferiores según la OMS ( teniendo como patología intraescrotal agregada el varicocele izquierdo ) (Cuadro 2 -3).

**Cuado 1**

PACIENTE	LH	FSH	T	E	PRL	TSH	T3	T4
1	4.1	9.6	20	38	6.8	1.3	80	12
2	2.1	3.8	32.1	46	6.5			
3	11	13	27.1	86	9.2	1.9	135	15
4	5.7	4.9	14.9	20	8.2	2	18	
5	9.5	7.4	29.4	43	7.5	1	156	18
6	5.7	7	25.2	39	10.5	2.4		16
7	6.1	3.3	15.5	25	12	1.3	128	12
8	5.2	7.7	13.3	20	9.1	1	128	18
9	5.1	13.2	11.7	34.2	9			
10	7.5	1.8	17.8	45	7.5	1.8	112	12
11	8.5	5.1	8.7	20	5.5			
12	4.1	3.2	6.1	23.8	5.5			
13	3.1	3.3	17.3	46	5.5	1.7	131	16
14	3.4	1.7	10.2	38	11			
15	4.3	5.2	21.3	25	5.5			
16	8	6.2	34	66	7	2.7	130	13.8
17	2.9	6.7	6.5	25	6.4			

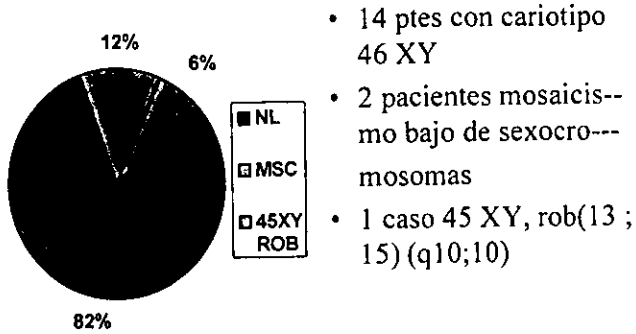
Cuadro 2

PACIENTE	VOL	DEN	A	B	MORF	AC	CULTV	CARIOTIPO
1	3.5	38	0	50	10	1	NEG.	Normal
2	2	68	0	22	12	1	NEG.	Normal
3	1.5	3	0	2	4	1	NEG.	Normal
4	1.5	17	0	10	28	1	NEG.	Normal
5	4	26	12	43	20	1	NEG.	Normal
6	4.3	16	0	23	8	1	NEG.	Normal
7	3	35	0	37	27	1	NEG.	Normal
8	3.8	5	0	2	4	1	NEG.	Normal
9	3	26	0	67	17	1	NEG.	Normal
10	1.5	92	0	12	26	1	NEG.	Normal
11	1.5	97	0	45	15	1	NEG.	Normal
12	2.7	140	0	10	47	1	NEG.	Normal
13	1.9	13	0	0	30	1	NEG.	Normal
14	2	62	0	5	9	1	NEG.	Normal
15	1	244	0	50	8	1	NEG.	45xy rob (13;15) (q10;q10)
16	0.2	15	0	11	26	1	NEG.	46xy acut 47 xyy
17	1	35	0	55	30	1	NEG.	46xy acut 47 xyy

Cuadro 3

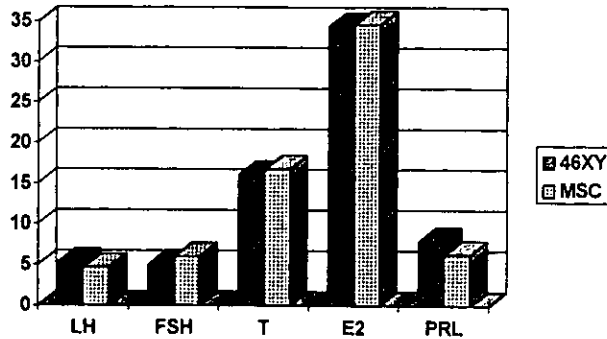
PACIENTE	VTD	VTI	D/T	USG TESTICULAR
1	9.14	12.74	3.6	Normal
2	18.03	18.93	0.9	Normal
3	11.45	11.68	0.23	quistes bilt epid.
4	14.11	14.36	0.25	quiste cab epid. Der
5	8.29	10.78	2.48	Normal
6	13.74	9	4.73	Normal
7	12.74	14.77	2.02	Normal
8	23.94	17.65	6.29	epididimitis bilt.+ hidrocele
9	14.11	11.68	2.43	Normal
10	19.32	16.83	2.49	varicocele derecho + hidrocele bilt.
11	16.02	20.6	4.58	microcalf test.+ hidrocele bilt. moderado + epid Izq.
12	16.83	15.26	1.57	quiste cab epid. Izq
13	18.62	18.53	0.92	epididimitis + hidrocele sev bilt.
14	29.47	33.22	3.75	epididimitis bilt.
15	14.86	11.77	3.08	Normal
16	12.21	12.38	0.17	varicocele bilateral + quiste de cabeza de epididimo izq.
17	19.79	21.98	2.19	varicocele G:l en testiculo izq.

## RESULTADO DE CARIOTIPOS GRAFICA 1

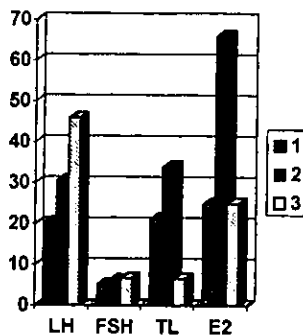


- 14 ptes con cariotipo 46 XY
- 2 pacientes mosaicis--mo bajo de sexocro---mosomas
- 1 caso 45 XY, rob(13 ; 15) (q10;10)

## PERFILES HORMONALES (promedio) GRAFICA 2

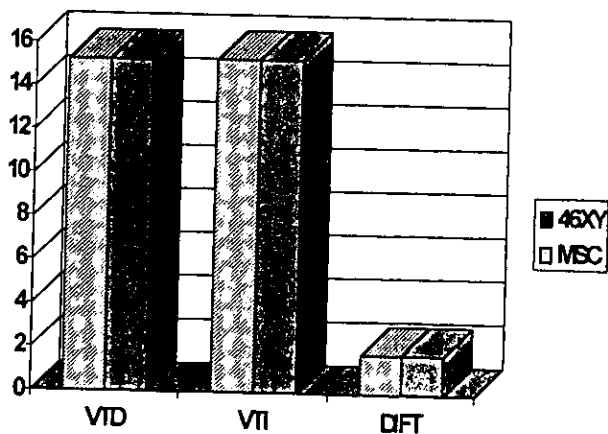


## PERFILES HORMONALES GRAFICA 3

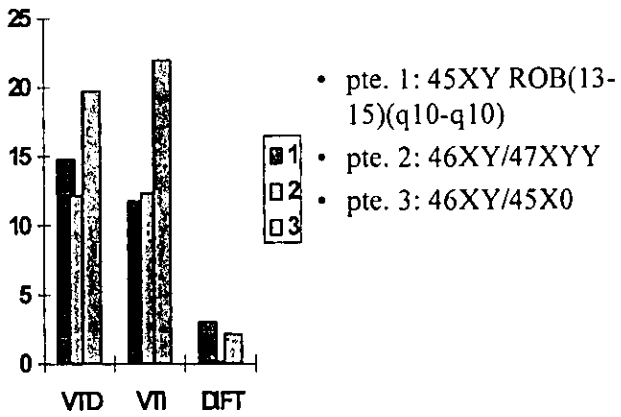


- pte. 1: 45XY ROB(13-15)(q10-q10)
- pte. 2: 46XY/47XYY
- pte. 3: 46XY/45X0

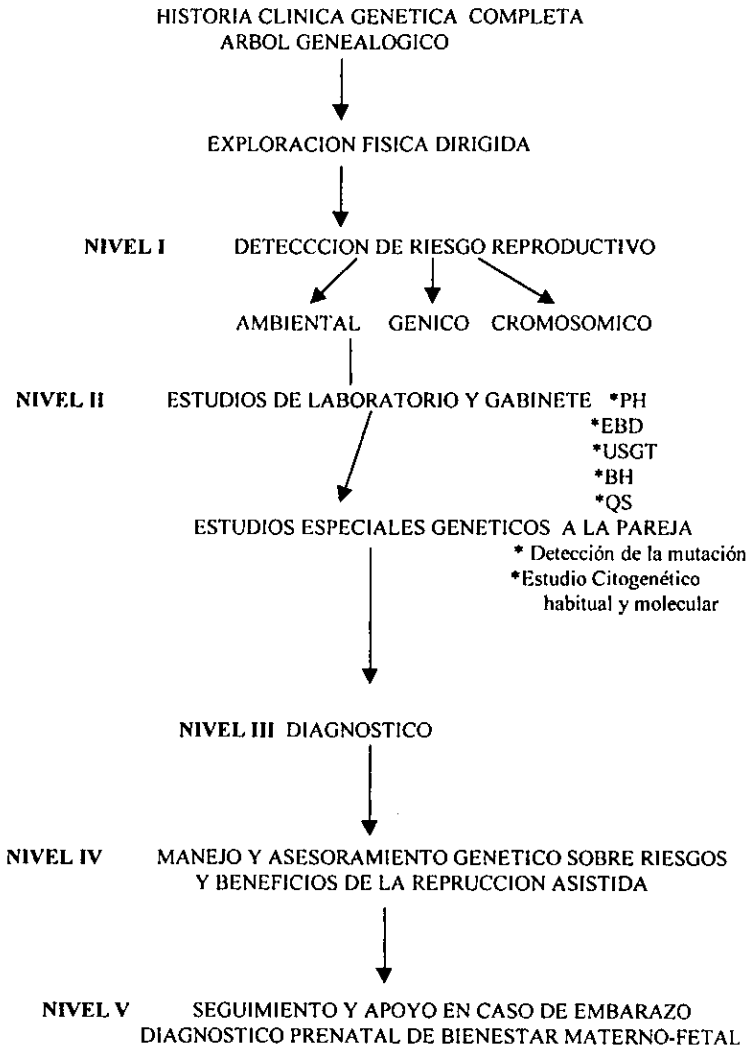
## VOLUMENES TESTICULARES



## VOLUMENES TESTICULARES MOSAICOS GRAFICO 6



# EVALUACION CLINICA Y GENETICA



## CONCLUSIONES

1.- Las alteraciones cromosomas asociadas a infertilidad masculina son frecuentes en población seleccionada, principalmente las formas en mosaico de sexocromosomas que lo que en muchos casos no se determina debido a su baja proporción celular en linfocitos de sangre venosa periférica por lo es necesario cubrir el estudio en fibroblastos de piel y estudio cromosómico en espermias con técnica de FISH para aneuploidías germinales o mosaicismos confinados a gónada. La patología testicular e intraescrotal no se excluye en estos casos. La presencia de alteraciones en mosaico bajos de sexocromosomas no excluyen la posibilidad de encontrarlos en mayor proporción en gónadas lo que pudiese tener un efecto sobre la espermatogénesis y explicar los resultados, para ello es necesario crear la infraestructura de apoyo con fluorescencia por hibridación in situ para muestras de semen y determinar señales haploides de cromosomas.

2.- Cabe mencionar que la exclusión de este tipo de alteraciones son pertinentes antes de indicar la reproducción asistida lo que representara mayor éxito en la reproducción al excluir a factores de riesgo intrínseco del paciente masculino.

3.- Como es reportado en la literatura, las causas más frecuentes de infertilidad masculina cubren los aspectos de alteraciones endocrinológicas e infecciosas como es el caso de este estudio preliminar en pacientes con infertilidad sin restarle importancia a las causas inmunológicas. Los resultados indican una relación importante de los eventos de infertilidad con testiculopatías y alteraciones intraescrotales, lo que permite retomar y estudiar su reversibilidad ante eventos aislados o bien la asociación entre falla testicular y endocrinopatía.



# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

## Bibliografía

1. Evans MI, Johnston MP, Isada N B. (1993). The Genetics Revolution and the Role of the Obstetrician. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 36: No. 3: 463-465.
2. Carlsen E, Giwercman A, Kieiding N, Skakkebaek NE Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years *BMJ* 1992 305:609-613
3. Greenhouse S, Rankin T, Dean J Genetic causes of female infertility: targeted mutagenesis in mice. *Am J Hum Genet* 1998 62:1282-1287
4. Lanh BT, Page DC Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 1997 278:675-680.
5. Gromoll M, Simoni M, Weinbauer G, Nnieshlag E Spermatogenesis-specific genes deleted in infertile men: DAZ/DAZH clinical aspects and animal models. In: Stefanini, Biotani C, Galdieri M, Geremia R, Palombi F (eds) *Testicular function: from gene expression to genetic manipulation* 1998 Springer-Verlag, Milan, pp 273-294.
6. Chai NN, Phillips A, Fernandez A, Yen PH A putative human male infertility gene DAZLA: genomic structure and methylation status. 1997 *Mol Hum Reprod* 3:705-708.
7. RuggiuM, Speed R, Taggart M, Mckay SJ, Kilanouski F, Saunders P, Dorin J, et al The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. 1997 *Nature* 389:73-74.
8. Loveland KL, Schlatt S Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene Knockouts. 1997 *J Endocrinol* 153:337-344.
9. Bestor TH Cytosine methylation an the unequal developmental potentials of the oocyte and sperm genomes. 1998 *AM J Hum Genet* 62:1269-1273.
10. Eddy EM Welch JE, O'Brien DA Gene expression during spermatogenesis. In: deKretse D (ed) *Molecular biology of the male reproductive system*. Academic Press, New York pp 181-232.

11. Yanagimachi R Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD The physiology of reproduction, 2d ed. Raven Press, New York, pp 189-317
  12. Johnson MD. Genetic risk of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil* 1998; 70:397-411.
  13. Van-Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Verheyen G, Devroey P, et al Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 1996; 11 (Suppl 4): 1-24.
  14. Peschka B Leygraaf J, van der Ven K, Shcartmann B, Schubert R, et al. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couple undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14:2257-2263.
  15. De Baraekeler M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; 6:245-250.
  16. Okada H, Fujioka H, Tatsumi N, Kanzaki M, Okuda Y, Fujisawa M, et al. Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14:946-952.
  17. Ratcliffe S. Long term outcome of sex chromosome abnormalities. *Arch Dis Child* 1999; 80:192-195.
  18. Wang C, Baker HWG, Burger HG, de Kretser DM, Hudson B. Hormonal studies in men with Klinefelter's syndrome. *Clin Endocrinol* 1975;4:399-414.
  19. Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Marin P, Rossato M, Garolla A, Ferlin A. Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3807-3810.
- This paper provides good insight into debate about whether men with complete (nonmosaic) Klinefelter's syndrome can produce sex chromosome haploid gametes.
20. Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, Assche EV, Devroey P, Bonduelle M, Steirteghem AV. Testicular sperm recover in nine 47 XXY klinefelter patients. *Hum Reprod* 1996; 11:1644-1649.
  21. Chevret E, Rousseaux S, Monteil M. Increased incidence of hyperploids 24 XY spermatozoa detected by three-colour FISH in a 46XY/47XY male. *Hum Genet* 1996; 97:171-175.
  22. Martini E, Geraedts JPM, Liebaers I, Land JA, Capitanio GL, Ramaekers FCS, Hopman AHN. Constitution of semen samples from XYY and XXY males as analysed by in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996; 11:1638-1643.

23. Cozzi J, Chevret E, Rousseaux S. Achievement of meiosis in XXY germ cells: study of 543 sperm karyotypes for an XY/XXY mosaic patient. *Hum Genet* 1994; 93:32-34.
24. Guttenbach M, Michelmann HW, Hinney B, Egel W, Schmid M. Segregation of sex chromosomes into sperm nuclein in a man with 47,Xxy Klinefelter's karyotype: a FISH analysis. *Hum Genet* 1997; 99:474-477.
25. Estop AM, Munne S, Ciepły KM, Vandermark KK, Lamb AN, Fisch H. Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence in-situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 1998; 13:124-127.
26. Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Stella M, Scandellari C. High incidence of sperm sex chromosomes aneuploides in two patients with Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:203-205.
27. Hennebicq S, Pelletier R, Rousseaux S, Sele B. Segregation of sex chromosomes in a Klinefelter patient (47,XXY) [abstract]. *Hum Reprod* 1999; 14:66. 15<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING OF THE ESHRE. Abstract book 1.
28. Persson JW, Peter GB, Saunders DM. Is ICSI associated with risks of genetic disease? Implications for counseling, practice and research. *Hum Reprod* 1996; 11:921-924.
29. Person JW. A hypothesis on the origin of germ cell mutation and evolutionary role of extra embryonic mutation. *Hum Reprod* 1999; :1840-1841.

In this paper we are reminded that germ cells migrate into the embryo from the extra-embryonic cell mass, and this may explain how it is possible to have mutations that are unique to the germ cell line. There is increasing realization that we may need to do cytogenetic studies on the sperm rather than on peripheral blood cells.

30. Foresta C, Rassato M, Garolla A, Ferlin A. Male infertility and ICSI: are there any limits? *Hum Reprod* 1996; 11:2347-2348.
31. Martin RH, Rademaker AW. Aneuploidy analysis in spermatozoa from a 47,XXY male [abstract]. *Hum Reprod* 1999; 14:134. 15<sup>th</sup> annual meeting of the ESHRE. Abstract book 1.
32. Chevret ERS, Montiel M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R, Sele B. Meiotic behaviour of sex chromosomes investigated by three-colour FISH on 35142.
33. Chandley AC, Edmond PE, Christie S, Gowans I, Flecher J, Frackiewicz a, Newton M. Cytogenetics and infertility in man.

- Results for a five-year study of men attending a subfertility clinic. *Ann Hum Genet* 1975;39:231-254.
34. Moog U, Coonen E, Dumoulin JCM, Engelen JJM. Karyotypes of men involved in ICSI programs: the Maastricht experience. April 1994 to date [abstract\*\*\* *Hum Reprod*1996; 11:223. 12<sup>th</sup> annual meeting of the EHSRE, Maastricht 1996.
  35. Short RV. The testis, the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. *Acta Paediatr (Suppl)* 1997; 422:3-7.
  36. Franco B, GUIOLO S, Pragiola A, Incerti B, Bardoli B, Tonlorenzi R, Carrozo R, et al Agene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neutral cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 1991; 353:529-536.
  37. Sauten RJ, Paulsen CA Hypogonadotrophic eunuchoidism. I Clinical study of the mode of inheritance. *J Clin ENDOCRINOL Metab* 1973; 36:47-54.
  38. Ma K, Sharkey Akirsch S, Vogt P, , Keil R, Harggreave TB, et al Towards the molecular localization of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1992; 1:29-33.
  39. Vogt P, Chandley AC, Harggreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992; 89:491-496.
  40. Tiepolo L, Zuffardi O. Location of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34:119-124.
  41. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Bergen AH, Nolten WE, Meisner L, Robets KP. Microdeletions in the chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997; 336: 534-539.
  42. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Rossato M, Barboux S, Debortoli A, Y-chromosome deletions in idiopathic testiculopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:175-1080.
  43. Simoni M, Gromoll J, Dwoniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A, et al Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertily Steril* 1997; 67:542-547.
  44. Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 1997; 12:1635-1641.

45. Stuppia L, Gatta v, Calabrese G, Franchi PG, Morisio E, Bombieri C, et al. A quarter of men idiopathic oligo-azospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11. *Hum Genet* 1998; 102:566-570.
46. Krausz C, Bussani-Mastellone C, Granchi S, Mc Elreavey K, Scarselli G, Forti G. Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14:1717-1721.
47. Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R, Hauser R, Botcham A, Lessing JB, et al. Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod* 1999; 14:33-38.
48. Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hil RE , Prosser EJ, et al. A Y chromosome Gene Family with RNA-binding protein homology: candidates for the Azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 1993; 75:1-20.
49. Brown GM, Furiong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchaeli M, et al Characterization of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrbinterval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet* 1998; 7:97-107.
50. Ferlin A,, Moro E, Onisto M, Toscano E, Brettella A, Foresta C. Absence of testicular DAZ gene expression in idiopathic severe testiculopathies. *Hum Reprod* 1999; 14:2286-2292.
51. Cooke HJ, Lee M, Kerr S, Ruggiu M. A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and females gonads. *Hum Mol Genet* 1996; 5:513-516.
52. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG Rosenberg M, Rozen S, et al. Diverse spermatogenetic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet* 1995; 10:383-393.
53. Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP Reijo R, Rosen S, Dinulos MB Disteche CM Page DC. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 1996; 14:292-299.
54. Habermann B, mi H, Krause W, Vogt PH. Localization of an SPGY gene product in human spermatozoa [abstract] . *Human Reprod* 1996; 11:54. Proceeding of the 12<sup>th</sup> annual meeting of the European Society of Human Reproduction.

55. Affra N, Bishop C, Brown W. Report of the second international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet Celi Genet* 1996; 73:33-75.
56. Soular M, Della Valle V, Siomi MC, Pinol-Roma S, Codogno P, Bauvy C, et al. HnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:4210-4217.
57. Delbridge ML, Ma K, Subbarao MN, Cooke HJ, Bhasin S, Graves JAM. Evolution of mammalian HNRPG and its relationship with the putative azoospermia factor RBM. *Mammalian Genome* 1998;9:168-170.
58. Caceres C, Ribes E, Muller S, Cornudella L, Chiva M. Characterization of chromatin-condensing proteins during spermatogenesis in a gastropod mollusc (*Murex brandaris*). *Mol Reprod Dev* 1994; 38:440-452.
59. Eliot DJ, Oghene K, Makarova O, Hargreave TB, Chandley AC, Eperon IC, Cooke HJ. Dynamic in the subnuclear organization of pre-mRNA splicing proteins and RBM during human germ cell development. *J Cell Sci* 1998; 111:1255-1256.
60. Schempp W, Binkele A, Armemann J, Glaser B, Ma K, Taylor K, et al. Comparative mapping of YRRM and TSPY related cosmic in man and hominoid apes. *Chromosome Res* 1995; 3:227-237.
61. Delbridge ML, Harry JL, Toder R, Waugh O'Neil RJ, Kun Ma, Chandley AC, Marshall Graves JA. A human candidate spermatogenesis gene, RBMI, is conserved and amplified on the marsupial Y chromosome. *Nature Genet* 1997; 15:131-136.
62. Dorfman DM, Genest DR, Reijo-Pera RA. Human DAZL 1 encodes candidate fertility factor in woman that localizes to the prenatal and germ cells. *Hum Reprod* 1999; 14:2531-2536.
63. Schwartz A, Chan DC, Brown LG, Alagappan R, Pettay D, Disteche C, et al. Reconstructing hominid Y evolution: X-homologues block, created by X-Y transposition, was disrupted by Yp inversion through LINE-LINE recombination. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1-11.
64. Jegalian K, Page DC. A proposed path by which genes common to mammalian X and Y chromosome evolve to become X initiative. *Nature* 1998; 394:776-780.
65. Henegariu O, Hirschmann P, Killian K, Kirsch S, Lengauer C, Maiwald R, et al. Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic

- Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrológica* 1994; 26:97-106
66. Simoni M, Nieschlag E. Molecular diagnostics of chromosomal microdeletions: the international quality control programmed of the European Academy of Andrology. *HUM Reprod* 1999; 14:92-93 15<sup>th</sup> annual meeting of the ESHRE. Abstract book 1. This paper represents welcome step towards laboratory quality control of Y microdeletion analysis. It is still very difficult to compare results form different centers, because all use different sequence tagged sites (Sets) in their analysis.
  67. Van Golde RJT, Nap AW, Turlings JHAM, De-Sutter P, Pieters MHEC, Giltay JC, et al. Reproductive decisions of men with microdeletions of Y chromosome: the role of genetic counseling. *Hum Reprod* 1999; 14:94. 15<sup>th</sup> annual meeting of the ESHRE. Abstract book 1.
  68. Lillford R, Jones AM, Bishop DT, Thornton J, Muller R, Case control study of whether subfertility in men is familial. *Br Med J* 1994; 309:507-573.
  69. Roest HP, Van Klaveran J, de Wit J, van Gurp CG, Kiken MHM, Vermy . Inactivation of the HR6B ubiquitin conjugating DNA repair enzyme in mice causes males sterility associated with chromatin modification. *Cell* 1996; 86:799-810.
  70. Panatazids AC, Galanopoulos vk, Zouros E. An autosomal factor form *Drosophila* males carrying the *D. arizonae* Y chromosome. *Genetics* 1993; 134:309-318.
  71. Simoni M, Gromoll J, Hoppner W, Kamischke A, Krafft T, Stahle D, Nieschlag E. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:751-755.
  72. Donat R, Mc Neil AS, Fitzpatrick DR, Hargreave TB, incidence of cystic fibrosis gene mutation in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens in Scotland. *Br J Urol* 1997; 79:74-77.
  73. Dean M, Santis G. Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of the CFTR gene mutations. *Hun Genet* 1994; 93:364-368.
  74. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van-Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1994; 61:1045-151.

75. De- Braekelleer M, Ferec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the deferens. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:669-677.
76. Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, et al. Mutations in cystic gene in patens with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995;332:1475-1480.
77. van der Ven K, Messer L, van der Ven H, Jeyerdan RS, Ober C. Cystic fibrosis mutation screening in healthy men reduced sperm quality. *Hum Reprod* 1996; 11:513-517.